

登革 II 型病毒经白纹伊蚊滞育卵的传递

郭晓霞¹, 赵彤言^{1*}, 董言德¹, 蒋书楠², 陆宝麟¹

(1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071; 2. 西南农业大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 采用 C6/36 细胞培养分离病毒的方法检测感染登革 II 型病毒的白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 滞育卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率, 从第一个生殖营养周期子代蚊虫中未分离到病毒, 第二与第三生殖营养周期子代蚊虫最低感染率没有显著性差异 ($\chi^2 = 0.01, P > 0.05$), 感染子代的批阳性率为 9.1%, 最低感染率为 1:330; 间接免疫荧光检测结果表明感染登革 II 型病毒的白纹伊蚊滞育卵孵化的子代成蚊能通过叮咬将登革病毒传播给敏感乳鼠。这些研究结果表明登革病毒能在媒介滞育卵内存活并传至子代, 子代蚊虫能通过叮咬敏感宿主水平传播病毒。

关键词: 白纹伊蚊; 登革 II 型病毒; 经卵传递; 水平传播

中图分类号: R384.1 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)04-0424-05

Transmission of dengue-2 virus by diapausing eggs of *Aedes albopictus*

GUO Xiao-Xia¹, ZHAO Tong-Yan^{1*}, DONG Yan-De¹, JIANG Shu-Nan², LU Bao-Lin¹ (1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 2. Department of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Virus isolation in C6/36 cells was used for detection of the infection rates of F₁ progeny from diapausing eggs of infected *Aedes albopictus*. Eggs from three gonotrophic cycles (GC) were collected, and vertical transmission was not observed in the first gonotrophic cycle, while there was no significant difference observed between the infection rates of the GC2 progeny and that of the GC3 progeny ($P > 0.05$). The total positive rate of pools was 9.1%, and the minimum infection rate was 1:330. The results of indirect fluorescent antibody test showed that F₁ adult mosquitoes obtained from diapausing eggs can transmit dengue-2 virus to sensitive mice horizontally through biting. The horizontal transmission rate was 6.1%. These results indicate that dengue-2 can be transmitted vertically even the infected eggs are induced into diapausing, and F₁ adult mosquitoes raised from diapausing eggs can transmit dengue-2 virus to sensitive mice horizontally via biting.

Key words: *Aedes albopictus*; dengue-2 virus; transovarial transmission; horizontal transmission

蚊虫经卵传递蚊媒病毒已经由实验室感染实验或野外观察得到证实, 如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 传播黄热病毒 (Aitken *et al.*, 1979), 白纹伊蚊 *Ae. albopictus* 传播 San Angelo 病毒 (Rosen, 1978) 以及三列伊蚊 *Ae. triseriatus* 传播 La Crosse 病毒 (Watts *et al.*, 1974; Woodring *et al.*, 1998) 等。近年来的研究表明, 自然界亦存在登革病毒 (dengue-2 virus, DEN-2) 经卵传递的现象 (Rodhain and Rosen, 1997; Lourenco-de-Oliveira *et al.*, 2002)。通过实验室研究证实从感染登革 II 型病毒的白纹伊蚊滞育卵内能够

检测和分离到病毒 (郭晓霞等, 2003)。在自然界中, 蚊卵在干旱和寒冷季节如果没有适于立即孵化的环境条件, 病毒能否度过不良环境以完成其传播周期, 是一个值得探讨的问题, 这将为登革病毒在自然界的储存提供新的观点。为此, 本研究采用 C6/36 细胞培养分离病毒、间接免疫荧光等方法, 进行了白纹伊蚊经滞育卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率检测以及成蚊叮咬敏感宿主传播病毒的实验, 以期确证登革 II 型病毒能否通过白纹伊蚊滞育卵传递至子代及水平传播。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39970665)

作者简介: 郭晓霞, 女, 1974 年 3 月生, 博士, 研究方向为病原生物学, E-mail: gaoxx99@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: aedes@263.net

收稿日期 Received: 2003-12-29; 接受日期 Accepted: 2004-04-02

1 材料与方 法

1.1 蚊种、病毒、细胞及实验小鼠

白纹伊蚊:广州株,4~6日龄成蚊,在(25±1)℃,相对湿度(75±5)%,每天光照14h的养殖室常规饲养。登革Ⅱ型病毒:新几内亚B株,乳鼠脑传代,液氮冻存储备用。C6/36细胞:28℃,5% CO₂培养条件下,DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养液(含10%小牛血清)传代培养。昆明小鼠:1~3日龄,由本院实验动物中心提供。羊抗鼠FITC荧光标记二抗:北京中山生物技术公司提供。

1.2 DEN-2 乳鼠脑病毒悬液制备与保存

每只1~3日龄健康乳鼠脑内接种DEN-2 C6/36细胞病毒悬液0.02 mL,在有纱窗设备的动物房中饲养,逐日观察。乳鼠5~7天发病,出现典型神经症状,在濒临死期时及时无菌解剖取出鼠脑,液氮研磨,用无血清DMEM培养基或0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.0)制备成20%鼠脑病毒悬液,10 000 r/min离心30 min,冻存管分装,液氮冻存储备用。C6/36细胞培养测定病毒滴度TCID₅₀为10^{7.07}~10^{8.8}。

1.3 人工经口感染蚊虫实验

人工配置病毒悬液(鼠血、10%葡萄糖和20%鼠脑病毒悬液的配比为1:1:1),将浸泡有病毒悬液的海绵块(1.5 cm×1.5 cm×0.5 cm)置平皿中,放入蚊笼,使饥饿18~24h的4~6日龄白纹伊蚊吸血1.5 h,-20℃冻麻,挑饱血雌蚊放入清洁小蚊笼内,饲以5%糖水。保持温度(29±1)℃、相对湿度(80±5)%,每天光照8 h。同时设置吸食正常鼠脑悬液的蚊虫作为阴性对照,喂食方法同感染蚊。

1.4 感染蚊卵的收集及滞育处理

收集感染白纹伊蚊第1、2、3生殖营养周期(gonotrophic cycles)48 h内产的卵,继续保持48 h湿润后置空气中干燥24 h,在(25±1)℃,相对湿度90%、每天光照14 h的环境中保存6天确保胚胎发育完全后进行处理(Hanson *et al.*, 1994)。收集完蚊虫3个生殖营养周期产的卵后,将存活的成蚊头部压片后用间接免疫荧光法(IFA)检测病毒,胸、腹部用C6/36细胞培养分离病毒法检测阳性率。

卵的滞育处理:将上述方法获得的白纹伊蚊卵置于LRH-250-G光照培养箱中。培养箱温度误差控制在±1℃,每日光照8 h,采用过饱和盐溶液保持相对湿度恒定为75%(Winston and Bates, 1960)。温度的设置为梯度降温(25℃→20℃→15℃→10℃,每

个温度段处理2天),随后,采用高温(10℃)8 h与低温(4℃)16 h交替进行的方法继续处理6周。

1.5 C6/36 细胞培养分离病毒检测 F₁ 代蚊虫感染率

用低氧水(500 mL已放置24 h的自来水中加入500 mg 幼虫饲料,在养虫室内发酵24 h,含氧量约3×10⁻⁷~5×10⁻⁷ kg/L)刺激滞育卵孵化,并在孵化过程中搅动给以刺激。收集不同生殖营养周期滞育卵孵化的F₁代幼虫和羽化7天的雌雄成蚊,每组30只,用DMEM细胞培养液研磨,离心后取上清液过滤除菌,接种C6/36细胞,37℃吸附1.5 h,弃研磨液,换含5%小牛血清的DMEM培养液,CO₂培养箱培养3~7天,观察细胞病变情况;无病变的连续盲传3代,对照细胞培养同时传代。

1.6 小鼠血清 DEN-2 病毒抗体检测

低氧水刺激滞育卵孵化后,取F₁代羽化5天的雌蚊每笼100只,叮咬1日龄健康乳鼠1窝(平均10只),叮咬时间为1.5 h,共设3个重复。取出被叮咬的乳鼠,放回原母鼠窝内饲养,逐日观察,常规饲养14天后眼球取血制备血清,间接免疫荧光法检测抗体。

常规方法制备DEN-2感染C6/36细胞抗原片,丙酮固定后作为抗原,将上述制备的抗血清用1×PBS(磷酸缓冲盐溶液)按1:30,1:50和1:80的比例稀释,作为一抗,进行间接免疫荧光染色,荧光显微镜下观察。具体步骤如下:10%山羊血清(用1×PBS按比例稀释)封闭,37℃孵育30 min;滴加一抗,37℃孵育1 h;PBS洗片,5 min/次,重复3次;滴加荧光二抗(预先用1×PBS将1%伊文氏蓝稀释100倍,然后用0.01%伊文氏蓝稀释荧光二抗),37℃孵育30 min;PBS洗片,5 min/次,重复3次;免疫荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 C6/36 细胞培养分离病毒法检测滞育卵孵化的 F₁ 代蚊虫感染率

C6/36细胞培养分离病毒法检测滞育卵孵化的F₁代蚊虫感染率,共检测66批1 980只蚊虫,检测结果见表1。第一生殖营养周期滞育卵孵化的F₁代蚊虫中没有分离到病毒;第二生殖营养周期蚊虫批阳性率为13.6%,最低感染率为1:220;第三生殖营养周期蚊虫批阳性率为10.3%,最低感染率为

1:290, 低于第二生殖营养周期 F_1 代蚊虫感染率, 但 χ^2 检验的统计结果显示第二与第三生殖营养周期 F_1 代蚊虫感染率之间没有显著性差异 ($\chi^2 = 0.01, P$

> 0.05)。C6/36 细胞培养分离病毒结果表明感染白纹伊蚊经滞育卵传递 DEN-2 的批阳性率为 9.1%, 子代最低感染率为 1:330 (0.3%)。

表 1 C6/36 细胞培养分离病毒检测滞育卵孵化的 F_1 代蚊虫感染率

Table 1 The infection rates of the F_1 progeny of diapausing eggs of orally infected *Ae. albopictus* by virus isolation in C6/36 cells

产卵周期 Oviposition cycle	虫态 Growth stage of mosquitoes	实验批数(只数) Number of tested pools (Number of mosquitoes)	阳性批数 Number of positive pools	批阳性率(%) Positive rate of pools	最低感染率 Minimum infection rate
1(3~7)*	幼虫 Larvae	5(150)	0	-	-
	雌成虫 Female adults	5(150)	0	-	-
	雄成虫 Male adults	5(150)	0	-	-
		15(450)(总计 Total)	0	-	-
2(9~14)*	幼虫 Larvae	6(180)	1	16.7	1:180
	雌成虫 Female adults	8(240)	1	12.5	1:240
	雄成虫 Male adults	8(240)	1	12.5	1:240
		22(660)(总计 Total)	3	13.6	1:220
3(16~23)*	幼虫 Larvae	9(270)	1	11.1	1:270
	雌成虫 Female adults	10(300)	1	10.0	1:300
	雄成虫 Male adults	10(300)	1	10.0	1:300
		29(870)(总计 Total)	3	10.3	1:290

* 血餐之后的天数 Days after an infectious blood-meal.

2.2 滞育卵孵化的 F_1 代成蚊叮咬乳鼠的水平传播

实验共设 3 个重复, 除第一批的 10 只乳鼠无非特异性死亡外, 第二批和第三批的乳鼠在叮咬后的第 2 天各有一只出现非特异性死亡, 从实验乳鼠总数中剔除。实验共检测 33 只小鼠血清抗体, 有 2 只血清中抗体为阳性(图 1:A), 乳鼠阳性率为 6.1% (表 2), 表明感染白纹伊蚊经滞育卵孵化的 F_1 代成蚊能将登革病毒通过叮咬传播给敏感宿主。

表 2 F_1 代成蚊叮咬后乳鼠的感染情况

Table 2 Transmission of dengue virus horizontally by F_1 adults mosquitoes through biting sucking mice

批次 Pools	实验乳鼠数 Number of mice tested	阳性乳鼠数 Number of positive mice	阳性率(%) Positive rate
I	10	1	10.0
II	9	0	0.0
III	14	1	7.1
总计 Total	33	2	6.1

A

B

图 1 感染 F_1 代成蚊攻击乳鼠后鼠血清 IFA 检测结果(50×)

Fig. 1 IFA test results of serum of mice bitten by infected F_1 adults mosquitoes (50×)

A: 阳性结果 Positive result; B: 阴性结果 Negative result.

3 讨论

本研究检测了感染登革 II 型病毒的白纹伊蚊三个生殖营养周期滞育卵孵化的 F_1 代蚊虫感染率。从第一个生殖营养周期滞育卵孵化的 F_1 代蚊虫中没有分离到病毒,与半套式 PCR 方法检测结果(郭晓霞等,2003)一致,与 Diallo 等(2000)在研究经口感染黄热病毒的埃及伊蚊垂直传递的实验中发现的现象类似,即在第一生殖营养周期的子代蚊虫中未分离到病毒,这可能与病毒在经口感染的蚊虫体内复制的时间有关。在病毒垂直传递实验的研究中发现,亲代成蚊感染病毒的方式是影响第一生殖营养周期子代蚊虫感染率的直接因素,如埃及伊蚊经胸接种登革 III 型病毒 3 天后,亲代成蚊喂血开始第一个生殖营养周期所产卵的子代感染率为 2.8%(Joshi *et al.*, 2002),这是因为经胸接种病毒的蚊虫,病毒不需在中肠细胞内完成复制循环再进入血淋巴,大大缩短了病毒在其体内复制的时间,因而在第一个生殖营养周期子代蚊虫中即可检测到病毒。而经口感染 DEN-2 的白纹伊蚊,通常病毒首先要通过中肠屏障再进入蚊虫的血淋巴,第 9 天以后,病毒才能感染卵巢,子代才有可能被感染(谢超等,2002),白纹伊蚊雌蚊在血餐后 3~7 天便完成第一生殖营养周期产卵,这可能是第一生殖营养周期子代蚊虫中没有分离到病毒的重要原因。

C6/36 细胞培养分离病毒法与半套式 PCR 方法(郭晓霞等,2003)检测滞育卵孵化的 F_1 代蚊虫感染率,经统计学检验,第二与第三生殖营养周期 F_1 代蚊虫感染率之间没有显著性差异($P > 0.05$),这与前人的研究结果有所不同。Diallo 等(2000)在埃及伊蚊垂直传递黄热病毒研究中发现随着感染蚊虫生殖营养周期数的增加,子代感染率逐渐升高;Rosen(1987)也通过实验发现子代蚊虫最低感染率有随雌蚊感染到产卵时间增加而上升的趋势。但也有学者报道随着感染蚊虫生殖营养周期数的增加,子代感染率逐渐下降(Beaty *et al.*, 1980; Turell *et al.*, 1982; 陈维钧等,1990)。本实验中,亲代雌蚊从接种病毒使之感染到产下第二个生殖营养周期的卵,历经 14 天的时间,而从感染到产下第三个生殖营养周期的卵,有 20 天左右的时间,如果按 Rosen(1987)的推论,随着亲代雌蚊感染到产卵时间的越长,生殖腔病毒量越多,子代感染率应该有逐渐升高的现象,但统计学检验结果表明第二与第三生殖营养周期 F_1 代

蚊虫感染率之间无显著性差异($P > 0.05$),即感染雌蚊生殖腔中病毒量对子代感染率没有显著性影响,这是否由于病毒的株系不同而造成研究结果的不同,有待进一步研究证实。本研究结果与文献记载比较分析,推测子代感染率在很大程度上并不都与生殖营养周期数有关,而与亲代成蚊感染病毒的途径、生殖腔感染的时间以及蚊种和病毒株系有关(Diallo *et al.*, 2000);此外,可能部分感染病毒的卵在经历滞育、孵化到羽化为成虫等过程中死亡,或感染的子代个体病毒滴度太低,或由于检测方法不够灵敏等因素都有可能造成子代阳性率降低。到目前为止,有关垂直传递的机制尚不十分明确,有待于进一步的实验研究来阐明。

Mourya 等(2001)报道常温保存 1~2 月的感染登革病毒的埃及伊蚊卵孵化的子代蚊虫仍然能够水平传播登革病毒。本研究证实通过滞育卵孵化的 F_1 代成蚊能将登革 II 型病毒通过叮咬传播给敏感乳鼠,传播的阳性率为 6.1%。林立辉等(2000)也通过实验证实经口感染 DEN-2 的白纹伊蚊 F_1 代和 F_2 代均可通过叮咬吸血传播病毒。本研究结果证实登革病毒不仅能在媒介滞育卵内存活并传至子代,且子代蚊虫能通过叮咬敏感宿主水平传播病毒,肯定了媒介滞育卵在登革热传播中的重要作用,这对探讨该病毒在自然界的循环具有重要的流行病学意义。

参考文献 (References)

- Aitken THG, Tesh RB, Beaty BJ, Rosen L. 1979. Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 119-121.
- Beaty BJ, Tesh RB, Aitken THG. 1980. Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29(1): 125-132.
- Chen WJ, Cai SM, Chen SL, Ge YC, Fang AH. 1990. A study on transovarial transmission of dengue type 1 virus in *Aedes aegypti*. *Chin. J. Microbiol. Immunol.*, 23: 259-270. [陈维均,蔡世盟,陈淑莉,葛应钦,方爱惠. 1990. 登革第一型病毒在埃及伊蚊体内经卵传播现象之探讨. 中华微免杂志, 23: 259-270]
- Diallo M, Thonnon J, Fontenille D. 2000. Vertical transmission of the yellow fever virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Dynamics of infection in F_1 adult progeny of orally infected females. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(1): 151-156.
- Guo XX, Zhao TY, Dong YD, Jiang SN, Lu BL. 2003. Study on diapause eggs of *Aedes albopictus* vertical transmission of DEN-2. *Chin. J. Vect. Biol. Contr.*, 14(1): 9-11. [郭晓霞,赵彤言,董言德,蒋书楠,陆宝麟. 2003. 白纹伊蚊经滞育卵传递登革 II 型病毒的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 14(1): 9-11]

- Hanson SM, Craig GB Jr, 1994. Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 31(2): 192–201.
- Joshi V, Mourya DT, Sharma RC, 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67(2): 158–161.
- Lin LH, Fang MY, Chen CH, Peng YF, 2000. Study on vectorial capacity spreading dengue virus by mosquitoes (*Aedes albopictus*). *Chin. J. Vect. Biol. Contr.*, 11(3): 173–176. [林立辉, 方美玉, 陈翠华, 彭翼飞, 2000. 白纹伊蚊传播登革病毒的媒介效能研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 11(3): 173–176]
- Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatznayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RM, 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(6): 799–800.
- Mourya DT, Gokhale MD, Basu A, Barde PV, Sapkal GN, Padbidri VS, Gore MM, 2001. Horizontal and vertical transmission of dengue-2 virus in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virologica*, 45(2): 67–71.
- Rodhain F, Rosen L, 1997. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: Gubler DJ, Kuno G eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Colorado: Center for Agriculture Bioscience International. 45–60.
- Rosen L, 1987. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C. R. Acad. Sci. [III]*, 304(13): 347–350.
- Turell MJ, Reeves WC, Hardy JL, 1982. Evaluation of the efficiency of transovarial transmission of California encephalitis viral strains in *Aedes dorsalis* and *Aedes melanimon*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31(2): 382–388.
- Watts DM, Thompson WH, Yuill TM, DeFoliart GR, Hanson RP, 1974. Overwintering of La Crosse virus in *Aedes triseriatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 694–700.
- Winston PW, Bates DH, 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41(1): 232–237.
- Woodring J, Chandler LJ, Oray CT, McGaw MM, Blair CD, Beaty BJ, 1998. Diapause, transovarial transmission and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58: 587–588.
- Xie C, Zhao TY, Yang FQ, Lu BL, 2002. An immunocytochemical study on the distribution of dengue 2 virus in *Aedes albopictus*. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 18–23. [谢超, 赵彤言, 杨发青, 陆宝麟, 2002. 登革 II 型病毒在白纹伊蚊体内分布的研究. 昆虫学报, 45(1): 18–23]

(责任编辑: 黄玲巧)